

Elisa Sonne

Siirtogeenisten Arabidopsis-kasvien morfologinen ja molekulaarinen kuvaileminen

Raportti

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko

Bioanalytiikka koulutusohjelma

Opinnäytetyö

14.4.2015

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Elisa Sonne Siirtogeenisten Arabidopsis-kasvien morfologinen ja molekulaarinen kuvaileminen 26 sivua + 2 liitettä 14.4.2015
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaaja(t)	Lehtori Hannele Pihlaja Vastuullinen Tutkija Kristiina Himanen
<p>Opinnäytetyö oli osa Helsingin Yliopiston Maataloustieteiden laitoksen tutkimusprojektia, jossa tutkitaan, kuinka FUPS-signaalit vaikuttavat kukan kehittymiseen. Työn tavoitteena oli seuloa T-DNA insertiomutanttilinjoja ja etsiä niistä homotsykoottiset mutaatiot ja ottaa käyttöön sekä standardoida infektointimenetelmä, jolla on mahdollisuus tutkia mutatoitujen E3-entsyymien vaikutuksia kasvien vasteisiin.</p> <p>Siirtogeenisten Arabidopsis thalianan siemenet kerättiin ja istutettiin steriilisti kanamysiiniä tai basta-herbisidiä sisältävälle selektiiviselle kasvatusmaljalle. Kasvien selviytymisprosentti laskettiin viikon itämisen jälkeen, jolloin saatiin alustavat tulokset T-DNA insertion homotsykoottisuudesta. DNA-eristys tehtiin isopropanolisaostuksella kahden viikon vanhoista kasvien lehdistä. DNA:lle tehtiin PCR-monistus, jolla tarkastettiin jo aiemmin tehdyn T-DNA insertion monistumis-tulokset. Lopullinen tulos saatiin tekemällä PCR-tuotteelle geielektroforeesi. Infektointimenetelmän käyttöönotossa ja menetelmän standardoimisessa käytettiin Columbia-0 -kasvia, joka infektoitiin kastamalla se Botrytis cinerea-sienen itiöitä sisältävään suspensioon.</p> <p>Työssä käytiin läpi 41 mutanttilinjakandidaatti kasvinlinjaa, joissa oli kahta erilaista T-DNA linjaa, joista toinen oli kanamysiiniresistentti ja toinen basta-herbisidiresistentti. Näistä kanamysiiniresistenttejä linjoja oli kuusi ja basta-herbisidiresistenttejä linjoja oli neljä. Insertiot olivat kahdeksassa eri geenissä. Näistä kymmenestä linjasta T-DNA insertio homotsykoottisena löytyi kuudesta, kaksi ohitettiin, yhden linjan tuloksena oli villityyppi ja yhdestä linjasta mutaatio löytyi heterotsykoottisena ja villityyppinä. Tavoitteena olleet infektointimenetelmän standardointi ja RNA-näytteiden kerääminen onnistuivat. Infektioinnissa hyödyllisimmäksi suspensioksi osoittautui vahvin konsentraatio. Tutkimusryhmälle jäi Infektointimenetelmästä saatujen RNA-näytteiden analysointi ja niiden tulosten standardointi menetelmään.</p>	
Avainsanat	T-DNA, FUPS, UPS, Botrytis cinerea, infektointi, PCR, Arabidopsis,

Author(s) Title Number of Pages Date	Elisa Sonne Morphological and molecular characterization of transgenic Arabidopsis plants 26 pages + 2 appendices 14 April 2015
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Kristiina Himanen, Ph.D, Principal Investigator Hannele Pihlaja, Senior Lecturer
<p>The study was a part of the project of the Department of Agricultural Sciences of the University of Helsinki that studied how FUPS-signals affect flower development. The aims of the study were to screen of the T-DNA mutant plant lines and to find homozygous mutants of them and to introduce and to standardize an infection method with the opportunity to research the mutant E3 enzyme's effect on flower responses.</p> <p>Seeds of the transgenic Arabidopsis plants were collected and planted in sterile Kanamycin or Basta herbicide containing the selective media. The plant survival was calculated a week after germination, and then a DNA extraction was done by isopropanol precipitation on leaves of the plants that were two weeks old. The DNA was subjected to PCR amplification, which inspected the results of the previously done T-DNA insertion. The final results were obtained by making a gel electrophoresis to the PCR product. Columbia-0 plant was used to introduce and standardize an infection method by dipping the plant into a suspension containing spores of the Botrytis cinerea fungus.</p> <p>The 41 mutant plant lines that were examined had two kinds of T-DNA insertion lines: six lines were kanamycin resistant and four lines were basta-herbicide resistant. These T-DNA insertions were placed in eight genes. Of these ten lines the T-DNA insertion was found as homozygous in six lines, two lines were skipped, one line was a wild type, and in one line the mutation was both heterozygous and a wild type. One of the aims of this study was standardize the infect method for plants. The most useful suspension to make the infection was the concentration of 10^6. The further task of the group will be to analyze the RNA samples and standardize them to the infection method.</p>	
Keywords	T-DNA, FUPS, UPS, Botrytis cinerea, infection, PCR, Arabidopsis,

Sisällys

1	Johdanto	1
1.1	tavoitteet ja tarkoitus	1
2	Arabidopsis thaliana	2
3	Ubikitiini-proteosomi järjestelmä	2
3.1	Ubikitiini	2
3.2	UPS	2
3.3	Entsyymit	3
3.4	Proteosomi	4
3.5	FUPS (Flowers Related Ubiquitin Proteasome System)	4
4	Opinnäytetyön materiaalit	5
4.1	Arabidopsislinjat	5
4.2	Botrytis cinerea viljelmä	5
5	Opinnäytetyön menetelmät	5
5.1	Siementen sterilointi	6
5.2	Steriili viljely	6
5.3	DNA:n eristäminen	6
5.4	Polymeraasiketjureaktio eli PCR	7
5.5	Geelielektroforeesi	8
5.6	Kukan infektointi suspension valmistaminen	9
6	Opinnäytetyön toteutus	9
6.1	Mutantti linjojen seulonta	9
6.1.1	Isopropanolisaostus	9
6.1.2	PCR	10
6.1.3	Geelielektroforeesi	11
6.2	Kukan infektointi	12
7	Tulokset	14
7.1	Mutantti linjojen seulonnan tulokset	14
7.2	Kukan infektiotehokkuuden tarkastelu	21

8 Johtopäätökset ja pohdinta	22
Lähteet	25
Liitteet	
Liite 1. Työohjeet	
Liite 2. T-DNA mutantti linjojen seulonnantulokset	

1 Johdanto

Opinnäytetyöni on osa tutkimusprojektia, jossa tutkitaan FUPS-signaaleja (Flower specific Ubiquitin Proteasome System). Kukan kehittymiseen liittyvien mekanismien tutkiminen on kiinnostavaa maatalouden kannalta, koska kasvien kukinnan ajankohta määrittää sadon onnistumisen. (Mäki-Kihniä 2013.)

Opinnäytetyössäni tutkimuksen kohteena ovat siirtogeeniset *Arabidopsis thaliana* kasvilinjat. Lähemmässä tarkastelussa on ubikitiini-proteosomijärjestelmän (UPS) E3 entsyymiä koodaavan geenin ekspression muutos, jota tutkitaan infektoimalla kasvi ja verraten sen ekspressoitumista ei infektoidussa kasvissa. Tutkimuksella pyritään vastaamaan siihen, miten paljon kyseisen geenin ekspressio muuttuu infektion aikana, ja standardoimalla tässä käytettävä infektiomenetelmä. Opinnäytetyössä käytetään yleisimpiä molekyyli-genetiikan menetelmiä, kuten DNA:n eristäminen, PCR ja geelielektroforeesi.

Tutkimuksella on hyötyä maatalouden tulevaisuuden kannalta, kun ottaa huomioon, että tällä hetkellä Suomessa ei kasva yhtään täysin alkuperäistä viljelykasvia. Toisaalta ilmasto on muuttumassa, jolloin tullaan taas kasvien kestävyys- ja viljelytehokkuuden kysymyksiin.

1.1 tavoitteet ja tarkoitus

Tutkimusryhmän, johon teen opinnäytetyöni, tavoitteena on selvittää, kuinka FUPS-signaalit vaikuttavat kukan kehittymiseen. Tutkimuksella on kauaskantoisia merkityksiä, kun opitaan tuntemaan kukan säätelymekanismeja, sekä kuinka niitä voisi hyödyntää tulevaisuudessa, esimerkiksi kuinka kukat selviävät niille stressaavissa tilanteissa, joita on muun muassa ilmastonmuutos, erilaiset maa-alueet sekä infektiot. (Mäki-Kihniä 2013.)

Opinnäytetyöni tavoitteena on käydä läpi T-DNA insertiomutanttilinjoja, ja etsiä niistä homotsykootit mutaatiot ja sisään ajaa infektointimenetelmä, jolla voidaan tutkia mutoitujen E3:sten vaikutuksia kasvien vasteisiin. Toisena tavoitteena, on standardoida menetelmä infektoinnin toteuttamiseen.

2 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana eli lituruoho on yksivuotinen ja vaatimaton kasvikunnan banaani-kärpänen, josta on tullut tutkijoiden suosikki kohde sen nopean elinkaaren vuoksi. Lituruohon elinkaari on noin kolme kuukautta, jolloin siemenet ovat kerättävissä. Vaatimattomalla lituruoholla, on viidessä kromosomi parissa 25 000 geeniä, ja koko sen genomi on selvitetty. (Welling 2008: 42.)

Lituruoho on ristikukkaikasvi, joka kasvaa 10–30 senttimetrin korkuiseksi, jonka kukka muodostuu neljästä terälehdestä ja lehdistä, jotka ovat muodoltaan soikeita. Lituruoho kasvaa karuilla alueilla, joissa isommat kasvit eivät kilpaile sen elintilasta, kuten tienpenkoilla ja asutuksen lähellä olevilla kallioilla. (Gullste'n – Lahti – Lehmuskallio – Lehmuskallio – Piippo 1997: 77; Welling 2008: 42.)

Lituruohosta on olemassa paljon erilaisia mutantteja, koska siihen on helppo siirtää geenejä geeninsiirrolla. *Arabidopsis thaliana* onkin käytetty monien kasvikunnan ihmisten selvittämiseen. (Welling 2008: 42.)

3 Ubikitiini-proteosomi järjestelmä

3.1 Ubikitiini

Ubikitiini on pienimolekyyli, joka on 76 aminohaponpitoinen polypeptidi. Tämä toimii merkinä tuhottavaksi halutussa proteiinissa. Ubikitiinin liittämisestä haluttuun proteiiniin vastaa kolme entsyymiä, joilla jokaisella on oma tehtävänsä. (Ciechanover ym. 2004; Heino - Vuento 2010.)

3.2 UPS

Ubikitiini-proteosomi järjestelmä on solun niin sanottu puhtaanapitojärjestelmä (Lehtinen 2013). Kyseinen järjestelmä löytyy jokaisesta eukaryootti solusta (Bailey – Ewan – Lee – Nelis - Sarandon 2012).

Ubikitiini-proteosomi järjestelmä lähtee käyntiin, kun adenotrifosfaatista (tästä eteenpäin ATP) saatavan energian avulla ubikitiini aktivoidaan E1 entsyymillä. Tämän jälkeen ubikitiini siirretään entsyymille E2. Ubikitiinin siirron E2:lle jälkeen E3 entsyymi tunnistaa tuhottavaksi halutun proteiinin ja kiinnittyy siihen. E2 entsyymiin kiinnittynyt ubikitiini on E3 entsyymiin kiinnittyneen tuhottavan proteiinin lähellä, jolloin ubikitiini voidaan siirtää kohdeproteiinille. Tämä ketju jatkuu niin kauan, kunnes tarvittavan pituinen polyubikitiini ketju on syntynyt. Polyubikitiini ketjun synnyttyä proteosomi tunnistaa syntyneen ketjun ja ubikitiiniketju irtaana proteiinista ja se siirtyy proteosomiin tuhottavaksi uudelleen käytettäväksi aminohapoiksi. (Ciechanover – Herskho – Rose 2004.)

3.3 Entsyymit

Ubikitiini-proteosomi järjestelmään kuuluvat kolme entsyymiä ovat, E1 ubikitiinin aktivoiva entsyymi, E2 ubikitiinin konjukoiva entsyymi ja E3 ubikitiini ligaasi.

E1 aktivoi ubikitiinin. Tämä kuluttaa yhden fosfaatin ATP:stä muuttuen adenodifosfaatiksi. Arabidopsis thalianalla on löydetty kaksi E1:n isomuotoa. (Hatfield – Carpenter – Gosink - Vierstra 1997.)

E2-entsyymi on ubikitiini-proteosomi järjestelmän toinen ubikitiiniin vaikuttavista entsyymeistä, joita on 37 kappaletta. E2:n N- ja C-päissä havaittujen isomuotojen arvelaan vaikuttavan kohdeproteiinin tunnistukseen ja lokalisointiin, joka taas vaikuttaa, mikä E3-entsyymi tuotetaan. (Bailey ym. 2012.)

Arabidopsis thalianalla on tähän mennessä löydetty seitsemän eri tyyppiä E3-ligaaseja, jotka ovat

- Skp1-Cullin-F-box (SCF)
- VHL-ELON-GIN-CUL2/5
- Cullin3 (CUL3)-Bric a brac
- Tramtrack and Broad complex/Pox virus and Zinc finger (BTB/POZ)
- UV-Damagad DNA-Binding protein 1 (CUL4-DDB1)
- Anaphase Promoting Complex (APC)
- RING/U-box

ja ne voidaan jakaa rakenteen mukaan kahteen ryhmään. E3:nen on monipuolisin ubikitiiniin vaikuttavista entsyymeistä. (Bailey ym. 2012.) E3:sia koodaavia geenejä on tällä hetkellä tiedossa monia satoja. E3:n spesifisyys on vaikuttimena siihen mitkä proteiinit merkitään tuhottaviksi. (Ciechanover ym. 2004.)

3.4 Proteosomi

Proteosomi koostuu 31 alayksiköstä, jotka muodostavat kaksi kompleksia: ydin- ja säätelykappaleet. Se on proteiineja takaisin aminohapoiksi tuhoava solunsisäinen proteiini-koneisto, joka käyttää energiakseen ATP:stä. (Bailey ym. 2012; Heino ym. 2010.)

Säätelykappale on 20 proteiinista koostuva polyubikitiini ketjun tunnistava osa ja muodostuu kahdesta alakompleksista, jotka sisältävät ATPaasi-alayksiköitä, koska proteosomin toiminta on täysin ATP:stä riippuvaista. Säätelykappale koostuu osista Lid ja Base, jotka tunnistavat polyubikitiini ketjun, poistavat ubikitiinin ja avaavat portin jolloin tuhottavaksi tarkoitettu substraatti päätyy ydinkappaleeseen pilkkottavaksi. Proteosomissa on kaksi säätelykappaletta, jotka ovat ydinkappaleen niin ylä- ja alapuolella eli toisiinsa nähden toisinpäin. (Bailey ym. 2012; Heino ym. 2010.)

Ydinkappale on neljästä heptameerisestä renkaasta koostuva proteiinin aminohapoiksi hajottava proteosomin osa, ja muodostuu kahdesta α_{1-7} - ja β_{1-7} alayksiköstä. Proteiinit hajotetaan peptideiksi β -alayksiköistä muodostuvissa proteolyttisissä kohdissa. Muodostuneet peptidit poistuvat proteosomista sytoplasmaan edelleen hajotettaviksi pienempiin osiin. Ydinkappaleessa on reseptoreja, jotka tunnistavat ubikitiiniä ja spesifejä E3:sia. (Bailey ym. 2012; Heino ym. 2010.)

3.5 FUPS (Flowers Related Ubiquitin Proteasome System)

FUPS projektin tavoitteena on tunnistaa ja kuvailla kukissa olevaa solujen ”puhtaanapitojärjestelmää”, jolla tuhoetaan ubikitiinilla merkittyjä proteiineja. Ubikitiini-proteosomi järjestelmä koostuu proteosomista, joka on iso proteiinikompleksi, missä tuhoaminen tapahtuu. Ubikitiinin E3 ligaasit tunnistavat kohde proteiineja, jotka ne merkitsevät ubikitiinilla. Ubikitiini on taas pieni molekyyli, jonka ketjuja proteosomi tunnistaa ja nappaa sen sisälleen ja pilkkoo sen. (Lehtinen 2013; Mäki-Kihniä 2013.)

4 Opinnäytetyön materiaalit

4.1 Arabidopsislinjat

Opinnäytetyöni materiaalina oli 41 erilaista mutanttikandidaatti kasvilinjaa (Liite 2). Näissä 41 kandidaatissa oli kahdenlaisia T-DNA linjoja, kanamysiinille ja basta-herbisidille resistentit ja näiden kahden linjan sisällä oli kymmenen eri linjaa, joissa T-DNA insertion paikka oli kahdeksassa eri geenissä. Näistä oli tarkoituksena etsiä homotsygoottiset mutaatiot. Yhteensä erilaisia läpi käytäviä insertioita oli kahdeksassa geenissä, joista käytän liukuvaa numerointia nimenä geeni 1, geeni 2 jne.

4.2 Botrytis cinerea viljelmä

Botrytis cinerea eli harmaahome on kasvitauteja aiheuttava laajalle alueelle levinnyt sieni, joka infektoi monia kasveja, puita sekä vihanneksia ja hedelmiä (Broad Institute 2010). Harmaahome tyypillisimmin tarttuu kasviin sen vioittuneista kohdista ja alkaa kasvattaa iturihmaa, joka kasvaessaan tunkeutuu kasvin solukkoon. Harmaahome on valinnainen loinen ja nekrotrofinen kasvitaudinaiheuttaja, jolla kyky tuottaa solumyrkkyjä ja happiradikaaleja. Nekrotrofisena kasvitaudinaiheuttajana harmaahome käyttää ravinnokseen tappamaansa kasviainesta. Selvittyään talvesta kuolleissa lehdistä tai oljissa, Botrytis cinerea alkaa tuottaa suvuttomia itiöitä, jotka leviävät ilmassa ympäristöönsä. (Choquer – Fournier – Kunz – Levis – Pradier – Simon & Viaud 2007; Hannukkala - Valkonen. 2013.)

5 Opinnäytetyön menetelmät

Opinnäytetyössäni T-DNA insertioiden tutkintaan käytettäviä menetelmiä ovat, kasvien steriiliviljely selektioalustoilla, deoksiribonukleiinihapon (DNA) eristäminen isopropanoli saostuksella, polymeerasiketjureaktio eli PCR ja geelielektroforeesi. Työni tavoitteena

on myös kasvihuoneessa kasvatettujen kasvien infektointi *Botrytis Cinerea*- sienellä. Työohjeet ovat tarkemmin liitteessä 1.

5.1 Siementen sterilointi

Siemenet steriloitiin seuraavasti: Ensin valittiin 1,5 ml sentrifuugiputkeen se määrä siemeniä, jotka haluttiin steriloida, jonka jälkeen niiden päälle pipetoitiin 1 ml 70 prosentista etanolia ja sekoitettiin kaksi minuuttia. Tämän jälkeen etanoli pipetoitiin pois ja lisättiin 2,5 prosenttinen natriumhypokloriitti ja 0,05 prosenttinen tween20 ja sekoitettiin käännellen 10 minuuttia. Seuraavaksi siemenet huuhdeltiin viiteen kertaan steriilillä vedellä, joista viimeinen lisäys jätettiin putkeen. (Pavicic 2014.)

5.2 Steriili viljely

Steriloinnin jälkeen siemenet viljeltiin laminaarissa steriileille MS-maljoille. Maljoja tehtiin tarpeen mukaan, maljan valmistamiseen tarvittiin Murashige ja Skoog – jauhetta (MS), joka sisältää myös tarvittavan MES-puskuriaineen, tulee 4,9 g, 10 grammaa soakeria ja 8 grammaa kasviagara. Alustan oli oltava pH-arvoltaan 5,8, jonka saamiseen käytettiin 1M KOH:ta tarvittava määrä, riippuen valmistettavasta määrästä. Aineiden sekoituksen jälkeen, pullo steriloitiin autoklaavissa. Steriloinnin jälkeen pulloa jäähdytettiin noin 60 asteeseen, jotta siihen voitiin lisätä antibiootti tai herbisidi. Tämän lisäyksen jälkeen, neste kaadettiin maljoille ja annettiin niiden jähmettyä. (Pavicic 2014.)

Siemenet viljeltiin aina MS-maljalle sekä maljalle, johon oli lisätty joko kanamysiiniä tai basta-herbisidiä riippuen siitä kummalle niiden linjan pitäisi olla resistentti. Viljelyssä apuna käytettiin pipettiä, jolloin oli mahdollista saada vain yksi siemen kerrallaan maljalle. Samalle maljalle oli mahdollista viljellä lähemmäs kolmekymmentä siementä. (Pavicic 2014.)

5.3 DNA:n eristäminen

DNA:n eristämisessä lehtimateriaalista menetelmänä käytettiin isopropanolisaostusta. Menetelmän periaatteena on, että DNA saostettiin näytteestä Isopropanolilla, jonka

jälkeen saostunut nukleiinihappo liotettiin puhtaaseen puskuriliuokseen (Solunetti a 2006).

DNA:n eristäminen aloitettiin laittamalla lämpöhaude lämpiämään 65 °C:n ja lisäämällä numeroituihin 1.5 ml mikroputkiin 300µl isopropanolia. (Pavicic 2014.)

Ensin survottiin nestemäisellä typellä jäädytetyt näytteet, jonka jälkeen jäädytys uusittiin ja murskattiin näytteet uudelleen. Tämän jälkeen lisättiin 400µl TNE puskuria ja murskaamista jatkettiin. Seuraavaksi näytteet inkuboitiin 65 °C 15 minuuttia ja sentrifugoitiin 15 minuuttia 4000 rpm (Revolution Per Minute). (Pavicic 2014.)

Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti siirrettiin 1.5 ml mikroputkiin jossa se sekoitettiin isopropanoliin putkea käännellen. Tämän jälkeen putkea sentrifugoitiin huoneenlämmössä 13 000 rpm:ää 20 minuuttia. Seuraavaksi supernatantti poistettiin ja lisättiin 500µl 70% etanolia ja sentrifugoitiin 5 minuuttia 13 000 rpm:ssa. Ylimääräinen supernatantti poistettiin ja saadun pelletin annettiin kuivua 30 minuuttia ja lopuksi pelletin päälle lisättiin 100µl TE puskuria. (Pavicic 2014.)

5.4 Polymeraasiketjureaktio eli PCR

Polymeraasiketjureaktio (PCR, polymerase chain reaction) on perimän tutkimusten yleisin menetelmä, jolla monistetaan tiettyä geeniä eksponentiaalisesti. PCR reaktiossa templaattina eli mallijuosteena voi olla kaksijuosteinen DNA, yksijuosteinen RNA tai komplementaarinen DNA (cDNA). (Haajanen – Pelkonen – Pärssinen – Suominen 2013.)

PCR:n periaatteena on käyttää DNA-polymeraasia, joka ei inaktivoidu lähellä 100 astetta, näitä polymeraaseja on eristetty kuumissa lähteissä elävistä bakteereista, yleisimmin käytössä on Taq-polymeraasi. Alukkeita, jotka ovat suunniteltu siten, että se rajaa vain tietyn geenin. PCR-reaktiossa toistetaan replikaatiota monta kertaa peräkkäin, jolloin saadaan monta kopiota kyseisestä geenistä, jonka jälkeen tulos analysoidaan elektroforeesilla. (Haajanen ym. 2013.)

PCR-syklin vaiheet ovat jaettu kolmeen osaan, joista ensimmäinen on denaturointi, tällöin reaktio lämpötila on nostettu lähelle 100 astetta, jolloin kaksijuosteinen DNA

muuttuu yksijuosteiseen muotoon. Toisessa vaiheessa DNA:n ollessa yksijuosteisessa muodossa ja lämpötila on hetkellisesti laskettu alemmas, jolloin alukkeet kiinnittyvät niille komplementaarisiin kohtiin templaattissa. Kolmantena vaiheena on pidennysreaktio, jolloin DNA-polymeraasi alkaa kiinnittää seoksessa olevia nukleotideja (dNTP) 3'-päästä kohti 5'-päästä, lämpötilan ollessa päälle 70 °C. Tätä kolmen osan sarjaa, denaturointi-alukkeiden kiinnitys-pidennysreaktio, sanotaan PCR-sykliksi. (Haajanen ym. 2013.)

PCR:ssä ohjelma, jota käytetään on:

1. 94 °C	2 minuuttia
2. 94 °C	30 sekuntia
3. 45 °C	30 sekuntia
4. 72 °C	1,5 minuuttia
5. 72 °C	5 minuuttia
6. 4 °C	jäähdytys

jossa kohdat 2-4 toistetaan 35 kertaa.

5.5 Geelielektroforeesi

Elektroforeesi tehdään agarosigeeliin, jossa nukleiinihapot erotellaan sähkökentässä koon mukaan, jolloin suuremmat molekyylit jäävät lähemmäs miinusnapaa niiden vauhdin hidastuessa sen kulkiessa geelin läpi. Pienemmät molekyylit liikkuvat pitemmälle. (Solunetti 2006.)

Geelielektroforeesin tulos visualisoidaan etidiumbromidi värjäyksellä. Etidiumbromidi lisätään suoraan geeliin, josta se konsentroituu DNA:han ja geeliä tarkasteltaessa UV-valolla etidiumbromidi näkyy oranssinpunaisena värinä. Molekyylien koon tarkasteluun on olemassa standardi koot, joihin verrataan geelijonon tuloksia. (Solunetti 2006.)

5.6 Kukan infektointi suspension valmistaminen

Kukat infektoidaan *Botrytis Cinerea*lla, jota ensin viljellään PCA-maljalle, joka valmistetaan perunasta, porkkanasta ja agarista. Sienen itiöt kerätään noin viikon kasvatuksen jälkeen ja steriloiduilla pinseteillä siirretään nestemäiseen PDA-suspensioon (Potato-Dextrose-Agar). Suspensio tehdään 1.8 grammasta peruna-sokeri jauhetta ja 100 millilitrasta steriloidusta vedestä. Kun kaikki itiöt on kerätty itiöt ja suspensio sekoitetaan vortexilla, jolloin halutut itiöt saadaan irrotetuksi ja sekoittumaan PDA-suspensioon. (Pavicic 2014.)

6 Opinnäytetyön toteutus

6.1 Mutantti linjojen seulonta

Siemenet steriloidiin ja viljeltiin noin kymmenen linjan sarjoissa, joissa jokaisessa käytettiin kontrollina Columbia-0:aa. Viljelyn jälkeen maljat peitettiin foliolla ja laitettiin +4 °C parin päivän ajaksi, jonka jälkeen ne siirrettiin kasvatushuoneeseen itämään.

Kun maljat olivat olleet viikon ajan itämässä, laskettiin niistä selviytyneet kukat ja prosentuaalinen osuus. Tästä saatiin jo alustavaa tietoa onko linja mahdollisesti homotsygoottinen. Tämä näkyi selektioalustoilla siten, että kaikki villityyppiset kuolivat, heterotsygoottisista kuoli neljäsosa ja homotsygooteista kaikkien pitäisi selviytyä eli ne ovat resistenttejä selektioalustalla olevalle antibiootille tai herbisidille. Laskennan jälkeen maljat, laitettiin kasvamaan vielä viikon ajaksi, jonka jälkeen niistä eristettiin DNA isopropanolilla ja tehtiin PCR.

6.1.1 Isopropanolisaostus

DNA eristämiseen käytettiin kahden viikon vanhoja kasveja. Eristäminen tehtiin yhdestä lehdestä, joka jäädytettiin nestemäisellä typellä. Jokaisesta kasvista otettiin rinnakkaiset näytteet molemmilta kasvualustoilta kasvaneista kukista eli jokaista kukkaa

edusti neljä näytettä. Kun DNA oli eristetty, näytteet siirrettiin jääkaappiin odottamaan seuraavana päivänä tehtävää PCR:ää.

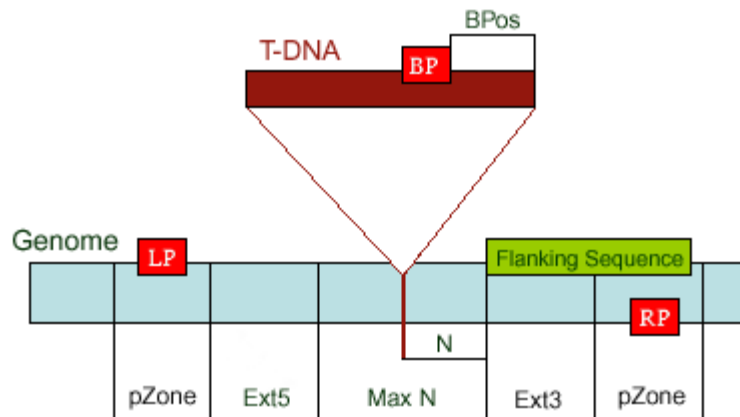
6.1.2 PCR

PCR tehtiin edellisenä päivänä eristetystä DNA:sta. PCR- reaktio tehtiin kaksinkertaiseen mastermixin, johon tulee taulukossa 1 olevat ainesosat.

Taulukko 1. Tarvittavat aineet 20 µl PCR-reaktioon

Aine	X1
Dynazyme Buffer 10X	2 µl
dNTP	0,4 µl
Aluke Reverse 10 µM	1 µl
Aluke Forward 10 µM	1 µl
Aluke BP	1 µl
DMSO	1 µl
Dynazyme	0,2 µl
Steriili vesi	13,4 µl
genominen DNA	2 µl

PCR:ssä käytettiin kolmea aluketta, kaksi rajasivat monistettavan geenin (LP ja RP) ja kolmas tunnisti T-DNA insertin (BP) (kuvio 1). Alukkeet valittiin geenin ja T-DNA:n mukaan, kolmannen alukkeen valintaan vaikutti se onko linja kanamysiini vai basta-herbisidi resistentti. Eli käytössä oli kaksi erilaista kolmatta aluketta. Kuviossa 1 esitetään miten insertin tunnistus aluke valitaan.



Kuvio 1. T-DNA insertin tunnistavan alukkeen (BP) valinta. Aluke on suunniteltu siten, että se tunnistaa osaa insertin nukleotidijärjestyksestä. PCR-reaktiossa monistuu BP:n ja RP:n välinen alue. (Lähde: <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>)

6.1.3 Geelielektroforeesi

Geelielektroforeesi tehtiin 1 prosenttiseen agarosigeeliin, johon lisättiin etidiumbromidia, joka sitoutuu DNA:han ajon aikana. Ennen näytteen pipetointia geeliin niihin lisättiin DNA latauspuskuria 2 µl jokaiseen 10 µl:aan. Geelielektroforeesin tulos oli luettavissa, kun näytteitä on eroteltu 100mV:lla 30 minuutin ajan. Kuviossa 2 kuvataan kolme mahdollista tulosta.



Kuvio 2. PCR:n kolme mahdollista tulosta. WT: Villityyppi, jossa ei ole insetiota, HZ: Heterotsykootti, jossa insertio on toisessa kromosomissa ja HM: Homotsykootti, jossa insertio on molemmissa kromosomeissa. (Lähde: <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>)

6.2 Kukan infektointi

Kukkien infektointiin käytettiin Columbio-0:aa, jotka olivat jo kasvaneet muutamia viikkoja niin, että niiden kukinta oli alkanut. Kukan infektointi aloitettiin viljelemällä *Botrytis Cinerea* maljalle ja viikon kuluttua itiöt kerättiin Potato dextrose – jauheesta tehtyyn nestemäiseen alustaan, jota sekoitettiin niin, että kaikki itiöt irtosivat ja sen jälkeen itiöiden määrä laskettiin Fuchs-Rosenthal – kammiossa mikroskoopissa.

Fuchs-Rosenthal – kammiossa on kaksi kammiota, joissa molemmissa on yhdeksän neliötä, joiden pinta-ala on 16 neliömillimetriä. Jokaisessa yhdeksässä neliössä on 16 pientä neliötä, joiden sivun pituus on 0,25 millimetriä ja jotka ovat pinta-alaltaan 0,0625 neliömillimetriä. Kumpaankin kammioon laitetaan kymmenen mikrolitraa itiöitä sisältävää suspensiota ja lasketaan molemmista kolme isoa neliötä eli kuusi isoa neliötä ja 96 pientä neliötä.

Saadut itiömäärä luvut merkittiin muistiin (taulukko 2). Näistä kuudesta, tässä tapauksessa viidestä laskettiin keskiarvo ja sen perusteella voitiin laskea itiöiden määrä millilitraa kohden, kaavalla $\text{keskiarvo} \cdot \text{DF} \cdot 5000$. Tarvittava itiömäärä oli vähintään miljoona itiötä millilitrassa.

Taulukko 2. Laimennettavan infektiosuspension konsentraation laskeminen

solu	A	B	C	D	E		
1	28	18	24	19	21		Conidia/ml
2	17	22	17	17	21		1,71E+06
3	16	16	19	20	18		
4	17	15	18	20	15		Keskiarvo*DF*5000
5	24	12	27	25	34		
6	24	14	30	23	24		
7	17	19	20	21	29		
8	25	31	23	26	21		
9	29	18	30	21	16		
10	19	30	23	18	22		
11	29	21	31	22	34		
12	16	11	16	24	22		
13	24	21	25	11	20		
14	26	33	26	22	13		
15	14	26	17	22	21		
16	17	22	21	16	13	keskiarvo	
	342	329	367	327	344	341,8	

Keskiarvon laskennan jälkeen tehtiin laimennus sarja 50 millilitran putkiin. Tämä aloitettiin laskemalla tarvittava määrä alkuperäistä suspensiota kaavalla $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$, jossa

C1: alkuperäisen liuoksen konsentraatio

V1: Tarvittava määrä alkuperäistä liuosta

C2: Laimennetun liuoksen konsentraatio

V2: Laimennetun liuoksen määrä.

Laimennussarja, joka tehtiin, oli konsentraatioltaan laskeva: $10^6, 10^5, 10^4, 10^3$ ja vertailun vuoksi viimeisenä sarjassa oli pelkkä nestemäinen ”pohja”, johon itiöt sekoitettiin.



Kuvio 3. Kukan infektoinnin kulku (kuva: muokattu Pavicic)

Infektoinnissa käytettiin kukkia, jotka olivat jo kukassa ja varsi oli noin kolmesta kymmeneen senttimetriä pitkä. Infektoinnin kulku on kuvattuna kuviossa 3 kohdittain, joista kohdassa a) infektiosuspensio on sekoitettu, kohdassa b) kukka kastetaan putkissa olevaan suspensioon ja kohta c) kuvaa sitä kuinka syvälle kukka on kastettava.

Infektointi tehtiin rinnakkaisina eli jokaisella konsentraatiolla infektoitiin kolme kukkaa eli yhteensä infektoitiin 15 kukkaa. Kukkiin merkittiin minkä konsentraation suspensiolla kyseinen kukka on infektoitu, ja ne siirrettiin erilliseen pieneen kasvihuoneeseen odottamaan 24 h, jonka jälkeen niistä otettiin kuvat ja 48 h päästä kuvaus uusittiin.

Oireiden kuvaamisen lisäksi infektoitiin vielä 12 kukkaa RNA-näytteitä varten, joista voidaan selvittää tutkittavan geenin ekspression muutosta. Infektointi tapahtui taulukon 3 mukaan.

Taulukko 3. RNA-näytteet

suspension konsentraatio	infektoinnista kulunut aika	infektoitujen kukkien määrä
Bc 10 ⁶	24h	3
Bc 10 ⁶	48h	3
MOCK	24h	3
MOCK	48h	3

Geenin ekspression tutkimista kukat infektoitiin vahvimalla konsentraatiolla, jotta ekspression mahdollinen kasvu olisi helpommin havaittavissa.

7 Tulokset

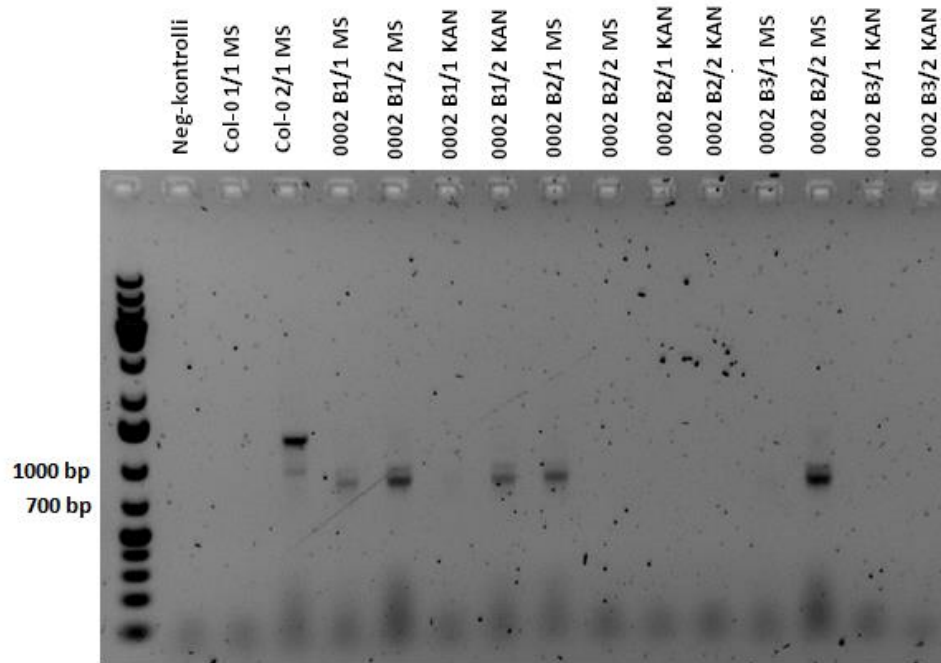
Tulokset osiossa tulen käymään läpi opinnäytetyöni tulokset mutaatiolinjojen seulonnan tulokset ja kukan infektoinnin erikseen. Mutaatiolinjojen tulosten kuvaus pohjautuu liitteen 2 taulukkoon.

7.1 Mutantti linjojen seulonnan tulokset

Mutaatiolinjat tarkistettiin kahdella tavalla, ensin steriilisti viljellyistä selektio-maljoista laskettiin selviytymisprosentti, joka antoi jo suuntaa antavia tuloksia T-DNA insertien homotsygoottisuudesta. Eli tällöin kasvien selviytymisprosentit kanamysiiniä ja basta-herbisidiä sisältävillä maljoilla lähentelee 100 prosenttia. Näistä saadut tulokset merkittiin liitteen 2 taulukkoon. Tulokset varmennettiin PCR:llä.

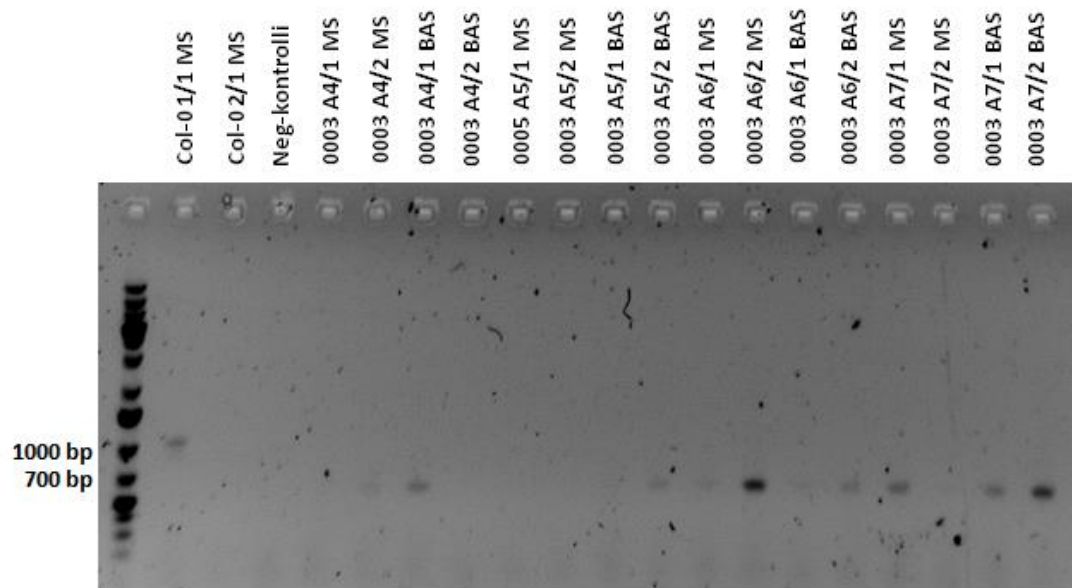
Kuviossa 4 on geelielektroforeesin tulos linja 098292 T-DNA insertiosta. Kuvan kaivossa 1 on negatiivinen kontrolli ja positiivinen kontrolli columbia-0 kaivoissa 2-3. Kaivossa kolme oleva kontrolli kuvaa villityypin geenin kokoa. Kaivoissa 4-7 on rinnakkaismäärittäminen näytteen B1 kukasta. T-DNA tunnistavan alukkeen ja oikean puoleisen alukkeen välinen pituus on 887 bp pitkä, jolloin juovan paikasta, joka on 1000 ja 700 bp välissä.

Juovan paikasta ja siitä, että niitä on vain yksi, voidaan päätellä B1 olevan homotsygoottinen T-DNA insertion suhteen. Kaivoissa 8-11 on näytteen B2 kasvi, jonka voidaan B1:n tavoin päätellä olevan homotsygootti. Kaivoissa 12–15 oleva B3:n analysointi epäonnistui ja tulosta ei saatu.



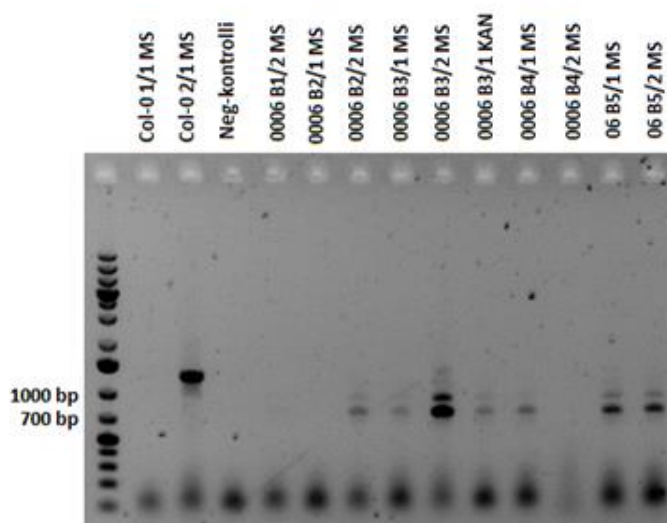
Kuvio 4. Geelielektroforeesi linjan 098292 T-DNA insertion PCR analyysistä geenissä yksi.

Kuviossa 5 on PCR:n tulos linjan 1223_D08 T-DNA insertiosta. T-DNA inserttion tunnistavan ja oikean puoleisen alukkeen välinen pituus on 705 emäsparia. Kun villityypin geenin tunnistavien alukkeiden välisen alueen pituus on noin 1000 emäsparia, jonka tulos on kaivossa yksi. Geelielektroforeesin perusteella, voidaan todeta, että kaivoissa 4-8, joissa on paikalla A4 kasvatetun kukan PCR:n tulokset, sekä kaivojen 12–15, joissa näytteenä on paikan A6, että kaivojen 16-19, joissa on paikan A7 näytteet ovat homotsygootteja insertion suhteen, koska PCR:n tulosten juovat ovat noin 700 emäsparin standardin kohdalla. Paikan A5, jonka tulokset näkyvät kaivoissa 9-11 jäivät epäselväksi PCR:n epäonnistumisen vuoksi.

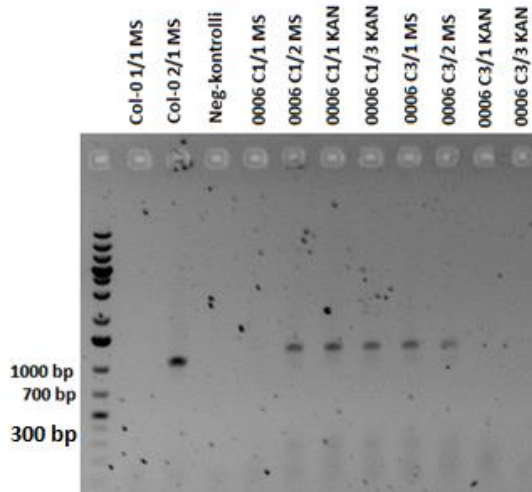


Kuvio 5. Geelelektroforeesi linjan 1223_D08T-DNA insertion PCR analyysistä geenissä kaksi.

Kuviossa 6 on PCR:n tulos linjan 149289 DNA insertiosta geenissä kolme. T-DNA insertion tunnistaa ja oikean puoleisen alukkeen pituus on 754 emäsparia ja villityypin geenin koko on noin 1200 emäsparia, jonka tulos on kaivossa kaksi. Geelelektroforeesin perusteella, voidaan todeta, että kaivoissa 4, jossa on paikalla B1 kasvatetun kukan PCR:n tulos, joka on epäonnistunut. Kaivoissa 5-13 olevat PCR tuotteiden tulokset ovat kaikki homotsygoottisia T-DNA insertion suhteen. Kuvassa 5 näkyy myös jokin ylimääräinen juova, joka on hiukan pidempi kuin etsimämme T-DNA insertio on.



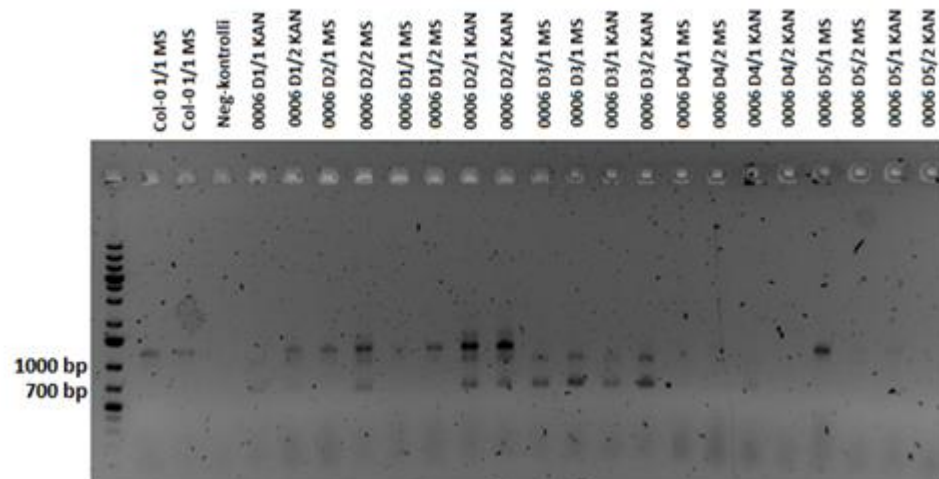
Kuvio 6. Geelielektroforeesi linjan 149289 T-DNA insertion PCR analyysistä geenissä kolme



Kuvio 7. Geelielektroforeesi linjan 014313 T-DNA insertion analyysistä geenissä 4.

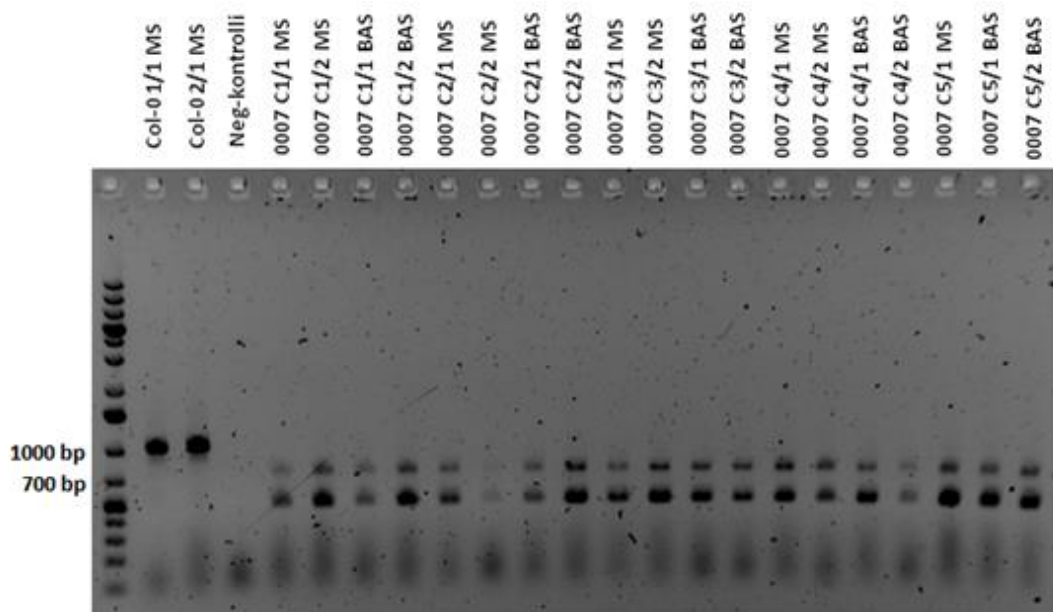
Linjan 014313 T-DNA insertion tulos jokaisella tekemällämme näytteellä on villityyppi, joka ilmenee kuvasta 7. Kuvassa näkyy vain yksi juova joka on yli 1100 bp pitkä, kun taas etsimme T-DNA insertion tunnistavan alukkeen ja oikean puoleisen alukkeen pituus on 344 bp pitkä.

Linjan 129604 T-DNA insertio on näytteillä D1-D2 heterotsygoottinen eli T-DNA insertio on vain toisessa kromosomissa olevassa geenissä. Kuviosta 8 nähdään D1-D2-näytteiden kohdilla kaksi juovaa, joista ylempi kuvaa geeniä 5 ja toinen T-DNA insertiota. Näytteissä D3 on vain T-DNA juova eli kyseessä on homotsygoottinen linja. D4 näytteet ovat epäonnistuneet. D5 on villityyppi eli insertiota ei ole kummassakaan vastingeenissä.

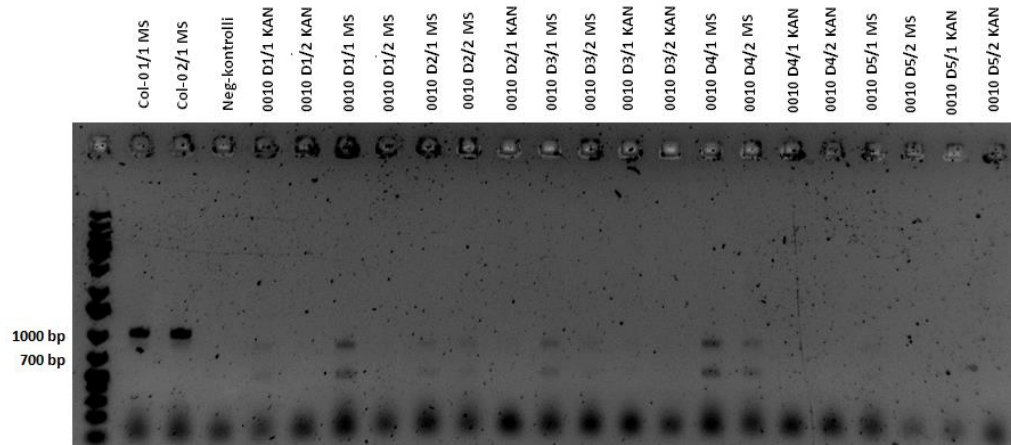


Kuvio 8. Geelielektroforeesi linjan 129604 T-DNA insertion analyysistä geenissä 5.

Kuviossa 9 kontrolli näytteinä olevat Columbia-0:t antavat paikan villityypin geenille kaivoissa 1-2, joka 1004 bp pitkä. Tämän linja T-DNA insertion tunnistavan alukkeen ja oikean puoleisen alukkeen välinen pituus on 705 emäsparia. Jokaisen tämän linjan näytteellä juovat ovat noin 700 emäsparin kohdalla, tällöin voidaan olla varmoja linjan 282_F01 T-DNA insertion olevan homotsygoottinen kaikilla viidellä näytteellä. Kaikilla viidellä näytteellä näyttäisi olevan epäspesifinen juova noin 500 emäsparin kohdalla.

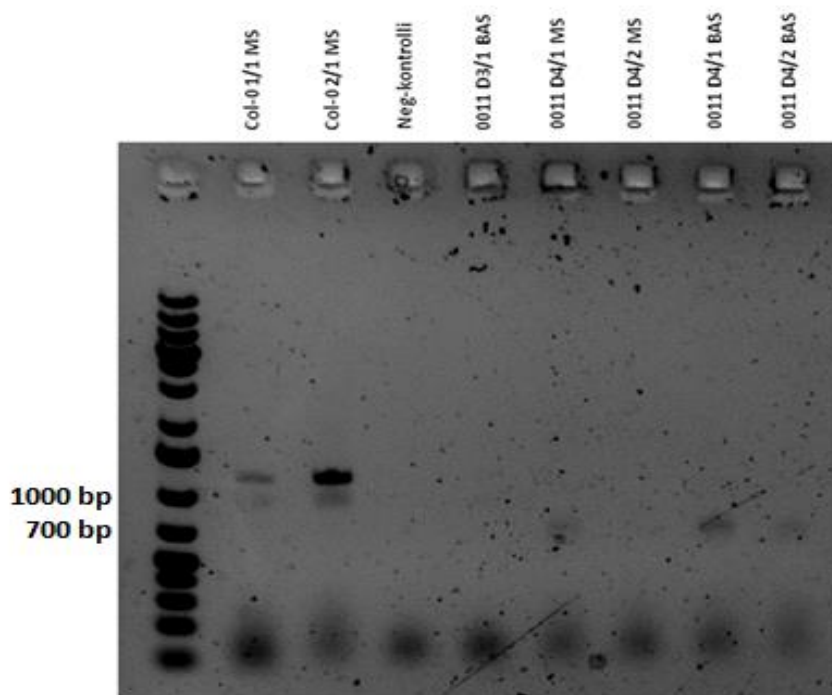


Kuvio 9. Geelielektroforeesi linjan 282_F01 T-DNA insertiosta geenissä 6.



Kuvio 10. PCR:n tulos linjan 316_D05 T-DNA insertiosta geenissä 7.

Linjan 316_D05 T-DNA insertio on geenissä seitsemän ja PCR:n tulos on näytteillä D1, D3 ja D4 homotsykoottinen, niiden T-DNA:n tunnistavan juovan ollessa noin 700 emäsparin kohdalla, sen ollessa todellisuudessa 703 emäsparia pitkä. D5 näytteen PCR on epäonnistunut. Kuviossa 10 näillä näytteillä on myös jokin ylimääräinen epäspesifi juova, joka on kuvion 8 tapaan noin 500 emäsparin kohdalla.



Kuvio 11. PCR tulos linjan 1222_B08 T-DNA insertiosta geenissä 8.

Linjan 1222_B08 T-DNA insertion tulos geenissä 8 näytteellä D4 on homotsykoottinen, juovan ollessa 740 emäsparin kohdalla. Kuvio 11 ilmenee myös, ettei D3-näytteelle saatu tulosta.

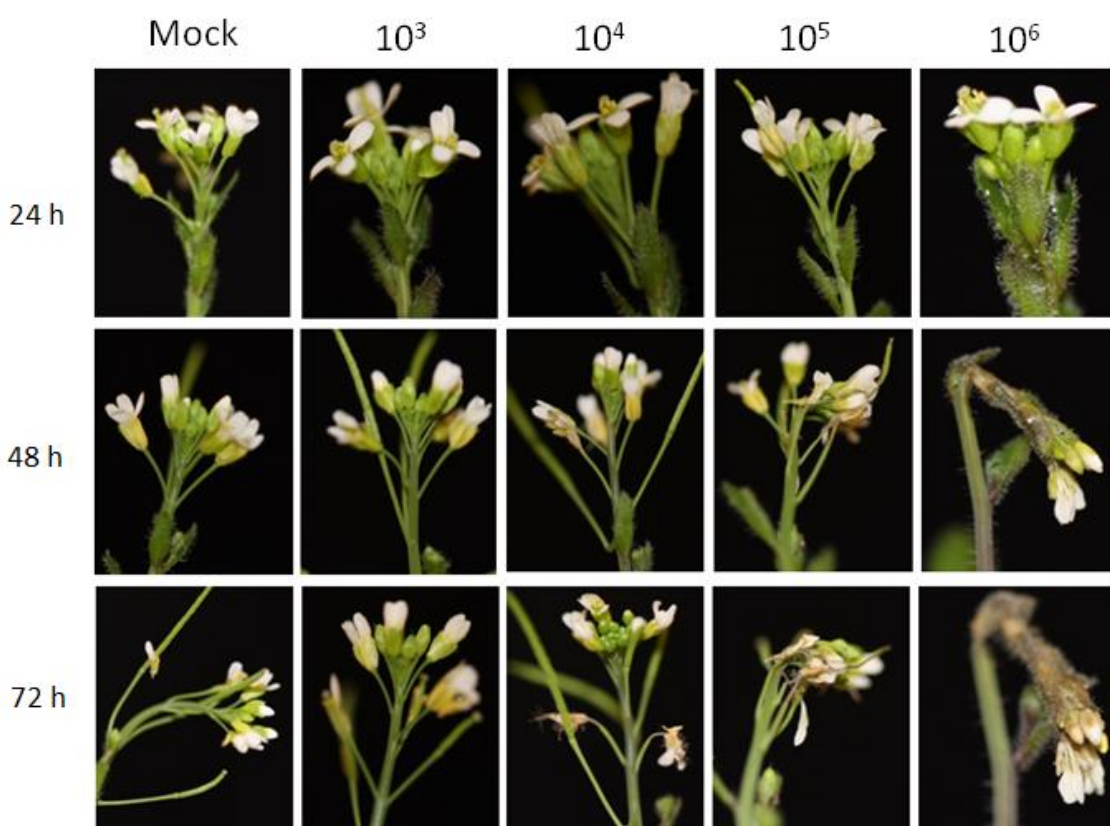
Yhteenvetona T-DNA linjojen läpi käymisestä voidaan todeta, että 41 kandidaattista löytyi 19 etsittyä homotsygoottista linjaa. Heterotsygoottisia linjoja oli kaksi, villityyppejä eli kandidaatteja, joissa T-DNA insertiota ei ole, on viisi. Kuudesta ei saatu mitään tulosta, yhdeksää ei käyty läpi ja yksi kuoli. Yhteensä T-DNA insertio löytyi homotsygoottisena kuudesta geenistä kahdeksasta (Liite 2). Kahdesta geenistä löydös oli villityyppi, nämä voisivat jatkossa toimia kontrolleina.

7.2 Kukan infektiotehokkuuden tarkastelu

Infektioinnin tulokset ovat kuviossa 12, josta näkyy kuinka *Arabidopsis thaliana* morfologia muuttuu eri vahvuisten infektiotensioiden vaikutuksesta ajan funktiona. Vaikutusajoiksi valittiin 24 h, 48 h ja 72 h infektoinnin jälkeen.

MOCK eli kontrollisuspensioon kastettu kukka ei muutu miksikään ajan kuluessa. Laimimmassa suspensiossa 10^3 kastetussa kukassa ei tapahdu mitenkään merkittäviä muutoksia. 10^4 konsentraation suspensiossa kastetussa kukassa 24 h ja 48 h jälkeen ei ole tapahtunut mitään muutoksia. Muutoksia voidaan huomata vasta 72 h jälkeen otetuissa kuvissa, jossa voidaan havaita pientä nuupahtamista.

Suspensio, jonka vahvuus on 10^5 , *Arabidopsis thaliana* ulkoasussa ei ole havaittavissa 24 h jälkeen minkäänlaisia muutoksia. 48 h jälkeen kukassa alkaa näkyä pientä nuupahtamista, mutta 72 h jälkeen kukasta näkee, ettei se ole kunnossa. Vahvimmalla suspensiolla 10^6 infektoidussa kukassa 24 h jälkeen ei ole oikeastaan ollenkaan mitään muutosta. Selvät muutokset ovat havaittavissa 48 h jälkeen ja 72 h jälkeen kukka on jo aikalaila kuollut.



Kuvio 12. Infektoinnin vaikutus *Arabidopsis Thaliana* morfologiaan (Kuva: Pavicic)

Suspensioista hyödyllisimmäksi osoittautui siis vahvin konsentraatio 10^6 . Tällä konsentraatiolla saadaan infektion vaikutukset esille jo 48 h jälkeen. Kuviossa 12 on kaksi kukkaa infektoidu 10^6 konsentraatioisella suspensiolla. Kuvasta näkee kuinka nopeasti infektio pääsee leviämään, kun se on päässyt ensin kukan suojakerrosten läpi.



Kuvio 13. Botrytis – infektion vaikutus *Arabidopsis Thaliana* morfologiaan 48 h ja 72 h jälkeen infektoinnista. (Kuva: Pavicic)

Saimme standardoitua menetelmän käyttö valmiiksi tuleviin infektointeihin. Infektointi tehdään kolmen rinnakkaisina eli jokaista konsentraatiota tulee edustamaan kolme kukkaa. Sopiviksi seurausajoiksi tulivat 24 h, 48 h ja 72 h.

Infektoinnissa käytetään sen helpottamiseksi detergenttinä silwer-77, joka lisätään nestemäiseen Potato dextrose – jauheesta tehtyyn nestemäiseen alustaan, jolloin se rikoo veden pintajännitystä ja helpottaa itiöiden kosketusta kukan kanssa.

8 Johtopäätökset ja pohdinta

Opinnäytetyöni tavoitteena oli etsiä kandidaateista genotyypiltään homotsykoottisia T-DNA insertioita, käyttämällä PCR:ää ja tarkastaa tulokset geelielektroforeesilla sekä ottaa käyttöön kukan Botrytis infektointi menetelmä ja standardoida se.

T-DNA linjojen läpi käymisestä voidaan todeta, että seulotuista 41 kandidaatista onnistuttiin löytämään 19 homotsygoottista mutaatiota, jotka menevät siementuotantoon ja siitä eteenpäin infektoitaviksi. Villityyppejä eli kandidaatteja, joissa T-DNA insertiota ei ole, löytyi viisi, olisiko niistä seuraaviksi kontrolleiksi? Heterotsygoottisia linjoja oli kaksi ja loppujen kanssa epäonnistuttiin DNA:n hukkuessa PCR-reaktion aikana. Näiden epäonnistuneiden linjojen kanssa PCR jää uusittavaksi, jotta saadaan selville niiden millainen on niiden T-DNA insertio. PCR:n tuloksissa oli joitain epäspesifisiä juovia noin 500 bp kohdalla muutamissa näytteissä, tästä jää tutkimusryhmälle pohdittavaksi mitä juova kuvaa.

Linjojen homotsygoottisuutta tutkittaessa linjat käytiin läpi kahteen kertaan, joista ensimmäinen oli selviytymisprosentin tarkastelu, joista voidaan tehdä vain alustavia johtopäätöksiä. Esimerkiksi kanamysiinille resistentin linjan, jonka selviytymisprosentin mukaan päätelisi olevan mutaation suhteen homotsygoottinen, onkin villityyppi eli siellä ei ole mutaatiota ollenkaan. Tämä voi johtua heterotsygoottisesta vanhemmasta jolloin mendelismi pätee. Voiko nämä kumminkin tulevaisuudessa saada T-DNA insertion suhteen homotsygoottisia jälkeläisiä?

T-DNA insertio on dominantti, jolloin heterotsygoottinen voi olla 100 prosenttisesti resistenttinen selektioalustalla. Mutatoituneen geenin aiheuttama ilmiasu vaatii insertin molempiin kromosomeihin jotta vaikutukset tulisivat esiin.

Kukan infektointimenetelmä saatiin valmiiksi ja hyödyllisin infektiotension konsentraatio, mutta tavoitteissa esitetty oireiden kunnollinen kuvaaminen ja menetelmän standardointi reaaliaikaisella PCR:llä ei onnistunut ajan loppuessa kesken.

Opinnäytetyön tavoitteisiin päästiin osittain, linjat saatiin käytyä läpi ja niistä saatiin kunnollisia tuloksia. Infektioinnin osalta tavoitteet olivat liian korkeat, joten menetelmän standardointi jäi tekemättä. Tämä jäi vähän harmittamaan, sillä olisi ollut mukavaa päästä tekemään reaaliaikaista PCR:ää. Eli tutkimusryhmälle jää tehtäväksi sen standardointi infektoiduista RNA-näytteistä.

Kerran opinnäytetyön aikana muutamalla steriilisti viljellyillä maljoilla kasvoi myös bakteereja ja osalla maljoja homea, jolloin opin, ettei steriilisti tekeminen aina onnistu ja kontaminaatioita tapahtuu. Löysin tapahtuneesta mielenkiintoisen puolen, koska mal-

joilla ei kasvanut mitään muuta kuin bakteereja siemenien ympärillä, joten käyttääkö bakteeri maljalla olevaa sokeria niin paljon itse hyödykseen, ettei siemenille jää mitään vai estääkö bakteeri siementen itämisen jollain tavalla.

Tulosten luotettavuutta ajatellen, kaikki työn osa-alueet, jotka kuuluivat työhön, tein mahdollisimman tarkasti, jotta saaduista tuloksista olisi hyötyä, tutkimuksen edetessä. Eettisyyden koin tärkeäksi, siinä että näytteet ovat ainutkertaisia ja niitä tulee käsitellä kunnioittavasti. Raportissa ei myöskään paljasteta tutkimusryhmän tutkimuskohteita ja siitä syystä tutkittavat kohteet olen nimennyt juoksevilla numeroinnilla.

Oli mielenkiintoista päästä tutustumaan tutkimuslaboratorioon ja nähdä eroja tutkittaessa kasveja, joista minulla aikaisempaa tietoa ei ole. Koin opinnäytetyön tekemisen mielenkiintoisena, vaikka alussa en ymmärtänyt mitä pitää tehdä ja mitä kaikkea kokonaisuus pitää sisällään. Kaikkien ohjeiden ja opetuksen ollessa englanniksi kokonaisuuden hahmottaminen kesti ja oli oikeastaan yksi suurimmista haasteista englannin kielen käytön ohella. Loppujen lopuksi olen tyytyväinen opinnäytetyöhöni.

Lähteet

Bailey, Mark – Ewan, Rachard – Lee, Jack – Nelis, Stuart – Sadanandom, Ari 2012. The Ubiquitin-proteasome system: central modifier of plant signaling. *New Phytologist* 2012 196: 13-28.

Broad Institute 2010. Botrytis cinerea Database. Broad Institute. Verkkodokumentti. <http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/botrytis_cinerea/MultiHome.html>. Luettu:12.1.2015

Choquer, Mathias – Fournier, Elisabeth – Kunz, Caroline – Levis, Caroline – Pradier, Jean-Marc – Simon, Adeline and Viaud, Muriel 2007. Botrytis cinerea virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiol Lett* 277 (2007) 1-10.

Ciechanover, Aaron - Hershko, Avram - Rose, Irwin 2004. "The 2004 Nobel Prize in Chemistry - Popular Information". Nobelprize.org. Nobel Media AB 2013. Verkkodokumentti. <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2004/popular.html>. Luettu 22.10.2014.

Gullste'n, Eeva – Lahti, Kari – Lehmuskallio, Eija – Lehmuskallio, Jouko – Piippo, Petri 1997. Suomalaisen kasviopas. Tammi. Belgia. 1997: 77.

Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani – Pärssinen, Raimo – Suominen, Ilari 2013. Geenitekniikka. Turun Ammattikorkeakoulu. Saarijärvi 2013: 153 -176.

Hannukkala, Asko - Valkonen Jari 2013. Sienten biologia. Sienet kasvitautien aiheuttajina. Toim. Timonen, Sari – Valkonen, Jari. Gaudeamus. Tallinna 2013: 239–244.

Hatfield, Peggy – Carpenter, Tami B – Gosink, Mark M – Vierstra, Richard D 1997. The ubiquitin-activating enzyme (E1) gene family in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* 1997. 11: 213-226.

Heino, Jyrki - Vuento, Matti. 2010. Biokemian ja solubiologian perusteet. WSOYpro. Helsinki 2010: 196–197.

Kuvio 1. Salk Institute Genomic Analysis Laboratory. T-DNA insertin tunnistavan alukeen (BP) valinta [17.3.2015]. <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>

Kuvio 2. Salk Institute Genomic Analysis Laboratory. PCR:n kolme mahdollista tulosta [17.3.2015]. <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>

Lehtinen, Päivi 2013. Siivoussysteemi kuntoon. Biomedicum. Verkkodokumentti. <<http://www.biomedicum.fi/index.php?page=2028&lang=1>>. Luettu: 20.10.2014.

Mäki-Kihniä, Nina 2013. Kukan kehitystä ohjaavat ubikitiinisignaalit. Tietysti.fi. Verkko-dokumentti.<<http://www.aka.fi/fi/T/Nuoret/Uusin-silmin/Esittelyssa-kuukauden-tutkija/Kukankehitysta-ohjaavat-ubikitiinisignaalit/>>. Luettu: 11.9.2014.

Solunetti 2006. Nukleiinihappojen eristys ja puhdistus. Solunetti. Verkkodokumentti. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_eristys_ja_puhdistus/2/>. Luettu: 10.1.2015.

Pavicic, Mirko 2014. Verification of T-DNA insertion in mutant plant lines. Protocols.

Welling, Annikki 2008. Luonnossa. Kasvit 2. Toim. Piirainen, Mikko. WSOY. Porvoo 2008: 42.

Verification of T-DNA insertion in mutant plant lines.

Protocols

Seed Collection

You will learn how to collect seed from dried siliques using forceps and palette knife. Besides you will learn how to handle transgenic seeds in order to prevent accidental spreading.

Media preparation

Materials

- Murashige and Skoog (MS) media (powder)
- MES (powder)
- Sucrose (solid stock)
- Plant agar (powder)
- KOH 1N

For 1 L

Weigh

- | | | |
|--------------|-------|------|
| • MS media | 4.9 g | |
| • MES | 0.5 g | |
| • Sucrose | | 10 g |
| • Plant Agar | 8 g | |

1. Dissolve MS, MES and Sucrose in 800 mL MilliQ water.
2. Adjust pH 5.8 using KOH.
3. Fill it up until 1L and add plant agar.
4. Autoclave for 15 min at 120° C.
5. When it finish, let the media cool down until you can touch it without burn your hand.
6. Add antibiotics/herbicide required and stir.
7. Pour the media in round plates for In vitro culture and let them solidify.
8. Use immediately or store them at +4° C.

Seed sterilization

Materials

- Ethanol 70%.
 - Sodium Hypochlorite 2.5%.
 - MiliQ water sterile.
1. Pour in a clean 1.5 mL microfuge tube the amount of seed to be sterilized.
 2. Add 1 mL of ethanol 70% and shake for 2 min.
 3. Using a pipette take ethanol out.
 4. Add 1 mL Sodium Hypochlorite 2.5% and shake for 10 min.
 5. Take sodium hypochlorite out and wash the seeds 5 times using MiliQ water.
 6. Leave water into the tube from the last wash.

Seed sowing

You will learn how to sow seed *in vitro* media using water superficial tension technique.

Plant material collection

1. Using forceps and scissors take one leaf from 2 weeks old plants.
2. Put it into a 1.5 microfuge tube, close and flash freeze in liquid nitrogen.

DNA isolation

Materials

- TNE buffer (200 mM Tris HCl pH 7.5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA pH 8.0; 0.5% SDS)
- Isopropanol
- 70% ethanol
- TE buffer (10 mM Tris HCl pH 7.5; 0.1 mM EDTA)

Use always Columbia-0 plants as controls!!

Before start turn on a thermal bath and set it at 65° C. Then fill with 300 µL isopropanol a number of 1.5 mL microfuge tubes equivalent to sample number.

1. Using a pestle grind the samples previously frozen in liquid nitrogen. Freeze them again and repeat the grinding.
2. Add 400 µL TNE buffer and keep grinding.
3. Put samples in a thermal bath at 65° C for 15 min.
4. Take the samples from the water bath and centrifuge at 4000 rpm for 15 min.
5. Transfer the supernatant to a 1.5 mL microfuge tube containing Isopropanol (previously added).
6. Mix by inversion (6-10 times).
7. Centrifuge 20 min at 13000 RPM (room temperature).
8. Discard the supernatant and add 500 µL of ethanol 70%.
9. Centrifuge 5 min at 13000 RPM (room temperature).
10. Discard the supernatant and let the pellet dry for 30 min face down on towel paper.
11. Resuspend the pellets en 100 µL TE buffer.
12. Store the samples one night at 4° C.
13. Do PCR immediately the next day.

PCR

Before to start remember book your spot to use thermal cyclers.

Materials

- Dynazyme Buffer 10X.
- dNTPs 10 mM.
- Primers 10 µM.
- DMSO.
- Dynazyme.
- Sterile MiliQ water.

For 10 µL reaction mix:

- | | |
|------------------------|--------|
| • Dynazyme Buffer 10X | 1 µL |
| • dNTPs 10 mM | 0.2 µL |
| • Primer Forward 10 µM | 0.5 µL |
| • Primer Reverse 10 µM | 0.5 µL |
| • DMSO | 0.5 µL |
| • Dynazyme | 0.1 µL |
| • Sterile MiliQ water | 6.2 µL |
| • Genomic DNA sample | 1 µL |

1. If you have several samples you can multiply the volumes above times samples number + 1. Prepare the mixture (mastermix) and put 9 µL per PCR tube to be used.
2. Vortex briefly and spin the samples down.

3. Put the samples into thermal cycler machine and run the following thermal protocol:

1. 96° C -----> 2 min
2. 96° C -----> 30 sec
3. 45° C -----> 30 min
4. 72° C -----> 1 min 30 sec
5. 72° C -----> 5 min
6. 4° C -----> ∞

Repeat step 2-4 35 times.

Check the results by electrophoresis.

DNA electrophoresis in agarose gels

Materials

- Agarose
- TAE buffer 1X (40mM Tris, 20mM acetic acid, and 1mM EDTA).
- Ethidium bromide
- DNA loading buffer 6X
- GeneRuler 1 Kb DNA ladder.

Before to start, use always gloves during this process especially while you are handling ethidium bromide. Ethidium bromide is highly carcinogenic and **MUST** be handled carefully. Use always ethidium bromide working station and material when you work with ethidium bromide.

1. Weigh the amount of agarose to be used in a relationship of 1 g agarose per 100 mL final vol. Small gels need 15 mL agarose, while medium and big require 35 and 300 mL agarose respectively. Let's use 300 mL gel as example.
2. Put 3 g agarose in a 500 mL Erlenmeyer flask.
3. Add 300 mL TAE buffer 1X and stir a little bit.
4. Put the flask into a microwave oven and heat until the agarose is completely melted.
5. Cool down a bit the agarose being careful not to solidify it.

Hereinafter we will handle ethidium bromide, use always gloves and lab coat.

6. Add 12 µL ethidium bromide and stir.
7. Pour the mix into a gel tray and set gel combs on top.
8. Let it solidify. The better the solidification the better the results, so take your time.
9. Change your gloves and prepare the samples.
10. Add 1 µL DNA loading buffer 6X every 5 µL DNA sample and mix.
11. Take your samples to ethidium bromide work station.
12. Once gel has solidified take combs out and place the gel tray into an electrophoresis chamber. The chamber should be filled with TAE buffer 1X, but if it is necessary add more TAE buffer 1X until the gel is completely covered by buffer.

13. Load the DNA samples mixed with DNA loading buffer 6X, skipping always the first well per row.
14. Load 5-10 µL GeneRuler 1 Kb plus DNA ladder in the first well.
15. Close the chamber and connect it to a power supply.
16. Run it for 45 min at 100 mV. To be sure that the run started, you should see bubbles appearing in at cathode area. After 2 min you should see also the blue staining entering into the gel.
17. Once the run has finished, place the gel into an UV chamber and take pictures of what you see.

Columbia-0 flowers *Botrytis cinerea* infection

Fungal media preparation

Homebrewed PCA (Potato Carrot Agar)-Cultivation for conidia collection

1. Prepare 300 g potatoes, unpeeled, sliced and chopped fine, 25g carrots, peeled and chopped fine (Optional, one tomato, chopped).
2. Add to 800-900 ml water.
3. Bring to a boil.
4. Simmer for 20 minutes.
5. Filter through miracloth (or equivalent) supported in a sieve into a beaker.
6. Add 10 g dextrose and 1.5 g yeast extract.
7. Adjust volume to 1 L with water.
8. Add 3.75 g agar to each of 4 500 ml bottles.
9. Add 250 ml PCA media to each bottle.
10. Autoclave sterile 121C x 15 minutes.
11. Store at 4C.

2/3 strength Difco PDA media (Potato Dextrose)- For infection

1. Add with stirring to 100 ml MQ water 1.8 g potato dextrose broth (Difco 254920).
2. Heat with microwave to boiling.
3. Boil 1 minute to completely dissolve powder.

Spore solution preparation for infection

1. Collect spores with forceps into a tube with required volume of PDA liquid media.
2. Vortex violently
3. Filtrate through microclothes into a tube
4. Counting spores number under microscope with a microslide that contain chambers. Infect concentration should around 1×10^6 spores per mL.

***B. cinerea* inoculation**

Columbia-0 seeds will be sown in peat-vermiculite soil (1:1 ratio) and to promote even germination the seed will be stratified by cold treatment (4° C) in darkness for three days. Later on, pots will be transfered to growth rooms under 12 hours light/ 12 hours dark photoperiod, 23° C. After one week, plants will be transferred to Thirty 9 cm pots,

containing peat-vermiculite 1:1. Bolting will take about 5-6 weeks after sowing. 4-5 cm shoots will be used for infections.

We will collect spores at 1×10^6 CFU and we will make dilutions series until 1×10^3 CFU. Flowers will be dip in each dilution point and the plants will be maintained under high humidity conditions. The symptoms will be evaluated along one week after inoculation. Considering that *B. cinerea* is a necrotrophic pathogen we expect observe necrotic flowers, siliques and stem bending. From these observations we will built a symptom scoring chart using as model the one reported by Urban *et al.* 2002 .

References

Urban, M., et al., Arabidopsis is susceptible to the cereal ear blight fungal pathogens *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. The Plant Journal, 2002. **32**(6): p. 961-973.

T-DNA mutantti linjojen seulonnantulokset

No.	Laatikko	Paikka	Linja	Geeni	Kasvatus alusta MS/KAN/BASTA	Siirretty kasvamaan	Selvinnyt/ MS	Yhteensä	%	Selvinnyt/ KAN/BASTA	Yhteensä (germinated)	%	Pvm.	PCR tulos
10	0001	B2	016013	1	KAN	12.1.2015	21	29	72 %	14	17	82 %	19.1.2015	Skipped
11	0001	B3	016013	1	KAN	12.1.2015	25	28	89 %	20	26	77 %	19.1.2015	Skipped
12	0001	B4	016013	1	KAN	12.1.2015	17	26	65 %	10	15	67 %	19.1.2015	Skipped
13	0001	B5	016013	1	KAN	12.1.2015	28	29	97 %	17	30	57 %	19.1.2015	Skipped
14	0001	B6	016013	1	KAN	12.1.2015	16	24	67 %	11	18	61 %	19.1.2015	Skipped
47	0001	F7	098292	1	KAN	12.1.2015	18	26	69 %	0	13	0 %	19.1.2015	
57	0002	B1	098292	1	KAN	19.1.2015	18	19	95 %	11	17	65 %	26.1.2015	HMz
58	0002	B2	098292	1	KAN	19.1.2015	23	25	92 %	16	20	80 %	26.1.2015	HMz
59	0002	B3	098292	1	KAN	19.1.2015	22	24	92 %	16	25	64 %	26.1.2015	Failed
84	0003	A4	1223_D08	2	BASTA	19.1.2015	22	30	73 %	18	27	67 %	26.1.2015	HMz
85	0003	A5	1223_D08	2	BASTA	19.1.2015	15	33	45 %	12	24	50 %	26.1.2015	Failed
86	0003	A6	1223_D08	2	BASTA	19.1.2015	30	31	97 %	25	28	89 %	26.1.2015	HMz
87	0003	A7	1223_D08	2	BASTA	19.1.2015	21	28	75 %	14	24	58 %	26.1.2015	HMz
217	0006	B1	149289	3	KAN	19.1.2015	11	24	46 %	0	11	0 %	26.1.2015	Failed
218	0006	B2	149289	3	KAN	19.1.2015	11	18	61 %	3	8	38 %	26.1.2015	HMz
219	0006	B3	149289	3	KAN	19.1.2015	19	30	63 %	0	6	0 %	26.1.2015	HMz
220	0006	B4	149289	3	KAN	19.1.2015	26	29	90 %	7	25	28 %	26.1.2015	HMz
221	0006	B5	149289	3	KAN	19.1.2015	17	26	65 %	0	15	0 %	26.1.2015	HMz
225	0006	C1	014313	4	KAN	19.1.2015	25	26	96 %	28	28	100 %	26.1.2015	WT
227	0006	C3	014313	4	KAN	19.1.2015	18	25	72 %	19	19	100 %	26.1.2015	WT
228	0006	C4	014313	4	KAN	9.2.2015	5	19	26 %	1	1	100 %	16.2.2015	WT
229	0006	C5	014313	4	KAN	9.2.2015	1	3	33 %	0	0	0 %	16.2.2015	WT
233	0006	D1	129604	5	KAN	9.2.2015	6	21	29 %	8	8	100 %	16.2.2015	HTz

No.	Laatikko	Paikka	Linja	Geeni	Kasvatus alusta MS/KAN/BASTA	Siirretty kasvamaan	Selvinnyt/ MS	yhteensä	%	Selvinnyt/ KAN/BASTA	Yhteensä (germinated)	%	Pvm.	PCR tulos
234	0006	D2	129604	5	KAN	9.2.2015	14	28	50 %	11	19	58 %	16.2.2015	HTz
235	0006	D3	129604	5	KAN	9.2.2015	15	22	68 %	13	15	87 %	16.2.2015	HMz
236	0006	D4	129604	5	KAN	9.2.2015	3	7	43 %	4	6	67 %	16.2.2015	Failed
237	0006	D5	129604	5	KAN	9.2.2015	12	19	63 %	9	11	82 %	16.2.2015	WT
266	0007	B2	143574	6	KAN	9.2.2015	18	20	90 %	6	20	30 %	16.2.2015	Skipped
267	0007	B3	143574	6	KAN	9.2.2015	0	0	0 %	0	0	0 %	16.2.2015	Skipped
273	0007	C1	282_F01	6	BASTA	9.2.2015	15	28	54 %	12	12	100 %	16.2.2015	HMz
274	0007	C2	282_F01	6	BASTA	9.2.2015	9	28	32 %	8	8	100 %	16.2.2015	HMz
275	0007	C3	282_F01	6	BASTA	9.2.2015	8	25	32 %	9	10	90 %	16.2.2015	HMz
276	0007	C4	282_F01	6	BASTA	9.2.2015	6	24	25 %	8	8	100 %	16.2.2015	HMz
277	0007	C5	282_F01	6	BASTA	9.2.2015	2	21	10 %	5	5	100 %	16.2.2015	HMz
409	0010	D1	316_D05	7	BASTA	23.2.2015	2	14	14 %	6	6	100 %	2.3.2015	HMz
411	0010	D3	316_D05	7	BASTA	23.2.2015	30	31	97 %	25	25	100 %	2.3.2015	HMz
412	0010	D4	316_D05	7	BASTA	23.2.2015	23	29	79 %	17	17	100 %	2.3.2015	HMz
413	0010	D5	316_D05	7	BASTA	23.2.2015	23	24	96 %	19	19	100 %	2.3.2015	Failed
443	0011	D3	1222_B08	8	BASTA	2.2.2015	0	1	0 %	1	1	100 %	9.2.2015	Failed
444	0011	D4	1222_B08	8	BASTA	2.2.2015	16	22	73 %	10	10	100 %	9.2.2015	HMz
445	0011	D5	1222_B08	8	BASTA	2.2.2015	0	1	0 %	0	1	0 %	9.2.2015	Died